

---

# **Actes des journées coton du Cirad**

**Montpellier, du 19 au 23 juillet 1999**

---

**Programme Coton  
Cirad-ca**

## DOSAGE DES ACIDES AMINES PAR HPLC

FAVREAU Bénédicte

Projet Technologie, Programme coton, CIRAD-CA, Montpellier

### 1- Introduction

Une méthode de dosage des acides aminés par HPLC a été mise au point au laboratoire de chimie de technologie cotonnière. Elle permet de séparer 17 acides aminés d'un mélange puis de les quantifier par HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

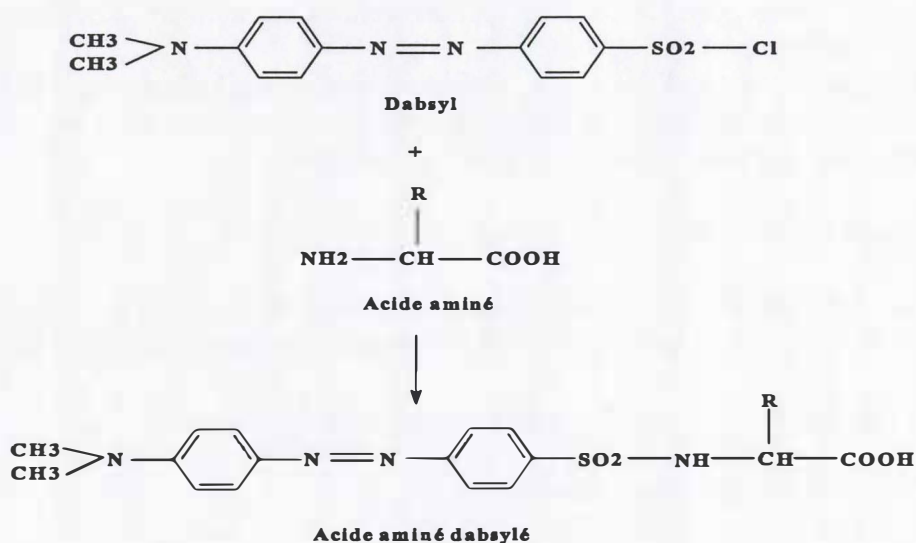
Cette analyse apportera des informations pertinentes dans le cadre du projet "films biodégradables" pour le suivi de la réticulation des films, ainsi que pour d'autres sujets d'étude tel que le dosage des acides aminés libres dans les feuilles de cotonnier. Elle sera également proposée comme analyse extérieure du laboratoire de technologie cotonnière.

### 2- Principe

#### 1ère étape : Dérivation des acides aminés

Le réactif de dérivation est le Dabsyl. Il a été choisi, préférentiellement à d'autres molécules, du fait de nombreux avantages (Chang, 1981 ; Drnevich, 1993 ; Hugues, 1987 ; Jansen, 1991 ; Krause, 1995), en particulier la détection des amines secondaires.

Le Dabsyl se fixe aux acides aminés selon la réaction suivante :



Les dérivés Acides Aminés - Dabsyl formés sont apolaires, contrairement aux acides aminés libres.

## **2ème étape : Séparation des acides aminés**

Un mélange de 2 solvants (phase mobile liquide) constitué de 78 % de solution aqueuse saline polaire et de 22% de solvant apolaire, est injecté en continu dans une colonne (phase stationnaire solide).

La solution d'acides aminés dérivés est injectée dans la colonne. Les acides aminés se fixent sur les sites hydrophobes C18 de la colonne car ils ont plus d'affinités pour ces sites que pour la phase mobile polaire.

En augmentant progressivement le % en solvant apolaire. Les acides aminés se détachent successivement de la phase stationnaire en fonction de leur affinité respective pour la phase mobile: le temps d'élution augmente avec l'hydrophobicité de l'acide aminé.

## **3ème étape : Détection et quantification des acides aminés**

Lorsqu'il y a désorption de l'acide aminé, il est entraîné par la phase mobile. En sortie de colonne, il est détecté par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 436 nm. Le signal émis par chaque acide aminé est intégré et traduit sous forme d'un pic. Le temps de rétention du pic (temps d'élution de l'acide aminé : laps de temps entre l'injection de la solution et la détection de l'acide aminé) et la surface du pic (dépendante de la concentration) sont spécifiques à chaque acide aminé.

Une droite d'étalonnage est déterminée par l'injection d'une gamme d'acides aminés de concentrations connues. L'équation de la droite d'étalonnage permettra le calcul des concentrations inconnues d'acides aminés à partir des surfaces des pics.

## **3- Mise au point du dosage**

La "dabsylation" homogène de tous les acides aminés réclame un strict respect des conditions expérimentales.

Après optimisation des conditions, les critères chromatographiques sont satisfaisants (répétabilité et reproductibilité des temps de rétention des pics :  $CV < 2\%$ , répétabilité et reproductibilité des surfaces des pics :  $CV < 3\%$ , linéarité  $R=1$ ).

## **4- Validation de la méthode**

Suite à cette mise au point, une étude de validation de la méthode est en cours. Elle est réalisée en accord avec les normes de la FDA (Bonnes Pratiques de Laboratoire).

Les étapes d'une validation de méthode de dosage par HPLC sont :

Précision (répétabilité, reproductibilité)

Linéarité

Limite de quantification

Limite de détection

Stabilité des solutions

Une fois ces paramètres définis, cette méthode sera appliquée à des protéines hydrolysées.